

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 <b>A61K 38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) 国際公開番号 <b>WO00/51629</b></p> <p>(43) 国際公開日 2000年9月8日(08.09.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01160</p> <p>(22) 国際出願日 2000年2月29日(29.02.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/52314 1999年3月1日(01.03.99)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 佐藤 泰(SATO, Yasushi)[JP/JP] 〒171-8545 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: <b>PREPARATIONS STABILIZED OVER LONG TIME</b></p> <p>(54)発明の名称 長期安定化製剤</p> <p>(57) Abstract Stable G-CSF preparations showing a residual G-CSF ratio of 90 % or more after a long-term storage test at 25 °C for 3 months; showing a residual G-CSF ratio of 90 % or more after a long-term storage test at 40 °C for 2 months; showing a residual G-CSF ratio of 90 % or more after an accelerated test at 50 °C for 1 month; or showing a residual G-CSF ratio of 90 % or more after an accelerated test at 60 °C for 2 weeks; and showing a ratio of the formation of the methionine residue-oxidized derivative of G-CSF of 1 % or less after an accelerated test at 50 °C for 1 month or after an accelerated test at 60 °C for 2 weeks. A method for inhibiting the formation of the methionine residue-oxidized derivative of a physiologically active protein having methionine residues characterized by adding methionine to a composition containing this protein.</p>		

25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下である、安定なG-C-S-F製剤。メチオニンを、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有組成物に添加することを特徴とする、該タンパク質のメチオニン残基酸化体生成の抑制方法も開示される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明細書  
長期安定化製剤

技術分野

- 5      本発明はG-C S F（顆粒球コロニー刺激因子）製剤に関し、特に長期保存した後も活性成分の損失が少なく、かつG-C S Fのメチオニン残基の酸化体生成率の低い、安定化させたG-C S F製剤に関する。

背景技術

- 10     G-C S Fは、好中球の前駆細胞に作用し、その増殖ならびに分化成熟を促進する分子量約2万の糖タンパク質である。

- 本出願人によって、口腔底癌患者の腫瘍細胞から採取した細胞株を培養することにより高純度のヒトG-C S Fが精製されて以来、これを契機に、ヒトG-C S F遺伝子のクローニングに成功し、現在では遺伝子工学的方法によって微生物や動物細胞で組換えヒトG-C S Fを大量に生産することが可能になった。また、  
15     本願出願人はこの精製したG-C S Fの製剤化に成功し、これを感染防御剤として市場に製品を供給している（特許第2116515号）。

- G-C S Fは極めて微量で使用され、通常成人一人当たり、0.1～1000  $\mu$ g（好ましくは5～500  $\mu$ g）のG-C S Fを含有する製剤を1～7回/週の割合で投与する。しかしながら、このG-C S Fは例えば注射用アンプル、注射器等の器壁に対し吸着性を示す。また、G-C S Fは不安定で、外的因子の影響を受けやすく、温度、湿度、酸素、紫外線等に起因して会合、重合あるいは酸化等の物理的、化学的変化を生じ、結果として大きな活性の低下を招く。  
20

- そこで安定なG-C S F製剤を市場に供給するために種々の処方設計がなされている。例えば、（a）トレオニン、トリプトファン、リジン、ヒドロキシリジン、ヒスチジン、アルギニン、システイン、シスチン、メチオニンから選ばれる  
25     少なくとも1種のアミノ酸；（b）少なくとも1種の含硫還元剤；又は（c）少なくとも1種の酸化防止剤；からなる群から選ばれる少なくとも1種を含む製剤（特許第2577744号）等が提案されている。また、安定化剤としてポリソルベートなどの界面活性剤を含むG-C S F製剤がある（特開昭63-1468

26号)。

また、容器への付着を少なくし、化学的変化を押さえるという観点からは、凍結乾燥製剤とすることが有利であり、マルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖を含有したG-C-S-F凍結乾燥製剤も報告されている

5 (特表平8-504784号)。

現在市場に供給されている製品には、これら化学的、物理的変化を抑制するために、安定化剤として一般的に使用されているヒト血清アルブミンあるいは精製ゼラチンなどのタンパク質が添加されているものがある。しかしながら、タンパク質を安定化剤として添加することに関しては、ウィルスのコンタミを除去する

10 等のために非常に煩雑な工程を必要とする等の問題があった。

しかしながら、このようなタンパク質を添加しない場合には、G-C-S-Fのメチオニン残基の酸化体の生成が多くなり、品質劣化をもたらすという問題があった。

#### 発明の開示

15 本発明の目的は、長期の保存にもより安定で、かつG-C-S-Fのメチオニン残基の酸化体生成率の低いG-C-S-F製剤を提供することである。

上記目的を達成するために鋭意研究した結果、本発明者らは安定化剤として特定アミノ酸を組み合わせることで、長期保存後でもG-C-S-F残存率が高く、かつG-C-S-Fのメチオニン残基の酸化体生成率の低いG-C-S-F

20 製剤となしうることを見だし本発明を完成した。

すなわち、本発明は、25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下である、安定なG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸

と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含む前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、疎水性アミノ酸がフェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから選択される前記のG-C-S-F製剤を提供する。

- 5 本発明はさらに、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、フェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含む前記のG-C-S-F製剤を提供する。

- 10 本発明はさらに、フェニルアラニン、アルギニン及びメチオニンを含む前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、安定化剤として、実質的にタンパク質を含まない前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、凍結乾燥製剤である前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、マンニトールをさらに含む前記のG-C-S-F製剤を提供する。

- 15 本発明はさらに、界面活性剤をさらに含む前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルである前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、界面活性剤がポリソルベート20及び／又は80である前記のG-C-S-F製剤を提供する。

- 20 本発明はさらに、pHが5～7である前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、pHが5.5～6.8である前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、pHが6.5である前記のG-C-S-F製剤を提供する。

- 25 本発明はさらに、G-C-S-FがCHO細胞から産生されたG-C-S-Fである前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸を含み、pHが5～7であることを特徴とする、25℃～3ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率

が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-CSF残存率が90%以上である、安定なG-CSF製剤を提供する。

- 5 本発明はさらに、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、フェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸を含み、pHが5~7であることを特徴とする、25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-CSF残存率が90%以上である、安定なG-CSF製剤を提供する。

本発明はさらに、pHが6.5である前記いずれかのG-CSF製剤を提供する。

- 15 本発明はさらに、メチオニンを、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有組成物に添加することを特徴とする、該タンパク質のメチオニン残基酸化体生成の抑制方法を提供する。

本発明はさらに、生理活性タンパク質が、サイトカインまたは生理活性ペプチドである前記の方法を提供する。

- 20 本発明はさらに、生理活性タンパク質が、コロニー刺激因子またはPTHである前記の方法を提供する。

本発明はさらに、生理活性タンパク質が、G-CSF、エリスロポエチンまたはPTHである前記の方法を提供する。

- 25 本発明はさらに、安定化剤として他のタンパク質を含まないことを特徴とする前記の方法を提供する。

本発明はさらに、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有組成物が、凍結乾燥されているかまたは溶液状態であることを特徴とする前記の方法を提供する。

本発明はさらに、メチオニンと他の一種以上のアミノ酸を含む、メチオニン残

基を有する生理活性タンパク質含有安定化組成物を提供する。

本発明はさらに、アミノ酸が、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、プロリン、グリシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン及びチロシンから成る群より選ばれる1種または2種以上である、前記メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有安定化組成物を提供する。

本発明はさらに、安定化剤として他のタンパク質を含まないことを特徴とする前記メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有安定化組成物を提供する。

#### 10 図面の簡単な説明

図1は、試料34及び36を、60℃－2週間加速試験を行った後に、後述する方法2に記載する方法で実施したクロマトグラムを示す。

図2は、試料34～36を、調製直後及び50℃－1ヶ月加速試験を行った後に後述する方法2で実施したクロマトグラムを示す。

15 図3は、パラサイドホルモン溶液製剤を、実施例6で示す方法（50℃－3日間保存）で実施した、メチオニンの添加によるメチオニン残基酸化抑制作用を示したHPLCクロマトグラムである。なお、図3中、中央の最も大きいピークがPTH未変化体であり、Met-8ピーク、Met-18ピークがそれぞれ、8番目のメチオニン残基が酸化されたPTH、18番目のメチオニン残基が酸化されたPTHである。

#### 20 発明を実施するための最良の形態

本発明の製剤に使用するG-CSFは高純度に精製されたヒトG-CSFであれば全て使用できる。具体的には、哺乳動物、特にヒトのG-CSFと実質的に同じ生物学的活性を有するものであり、天然由来のもの、および遺伝子組換え法によって得られたものを含む。遺伝子組換え法によって得られるG-CSFには天然のG-CSFとアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列の1または複数を欠失、置換、付加したもので前記生物学的活性を有するものを含む。本発明におけるG-CSFは、いかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト腫瘍細胞の細胞株を培養し、これから種々の方法で抽出し分離精製したもの、

あるいは遺伝子工学的手法により大腸菌などの細菌類；イースト菌；チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、C127細胞などの動物由来の培養細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。好ましくは大腸菌、イースト菌又はCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。最も好ましくはCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。

本発明のG-C-S-F製剤には好ましくは安定化剤としてヒト血清アルブミンや精製ゼラチンなどのタンパク質を実質的に含まない。

本発明のG-C-S-F製剤は、25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下、好ましくは検出限界以下であり、従来知られているG-C-S-F製剤に比べて極めて安定な製剤である。

本発明のG-C-S-F製剤の一例は、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、好ましくはリジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸、好ましくはフェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含むG-C-S-F製剤である。

さらに、本発明のG-C-S-F製剤の一例としては、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、好ましくはリジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸、好ましくはフェニルアラニン、



トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含み、pHが5～7であることを特徴とする、25℃－3ヶ月長期保存試験後におけるG－C S F残存率が90%以上であるか、40℃－2ヶ月長期保存試験後におけるG－C S F残存率が90%以上であるか、50℃－1ヶ月間の加速試験後におけるG－C S F残存率が90%以上であるか、60℃－2週間の加速試験後におけるG－C S F残存率が90%以上であり、かつ50℃－1ヶ月間の加速試験後又は60℃－2週間の加速試験後におけるG－C S Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下である、安定なG－C S F製剤である。

本発明で用いるアミノ酸は、遊離のアミノ酸ならびにそのナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩などの塩を含む。本発明の製剤には、これらのアミノ酸のD－、L－およびDL－体を含み、より好ましいのはL－体ならびにその塩である。

本発明の製剤に添加するアミノ酸の添加量は使用するアミノ酸の種類により、後述する試験方法を用いて好ましい範囲を定めることができる。一般には最終投与量として、0.001～50mg/mlである。例えば、フェニルアラニンでは好ましくは0.1～25mg/ml、さらに好ましくは1～20mg/mlであり、アルギニンでは好ましくは0.1～25mg/ml、さらに好ましくは1～20mg/mlであり、メチオニンでは好ましくは0.001～5mg/ml、さらに好ましくは0.01～4mg/mlである。

本発明の製剤には等張化剤として、ポリエチレングリコール；デキストラン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、グルコース、フラクトース、ラクトース、キシロース、マンノース、マルトース、シュークロース、ラフィノースなどの糖類を用いることができる。マンニトールが特に好ましい。マンニトールの添加量は製剤中に1～100mg/ml、さらに好ましくは5～60mg/mlである。

本発明の製剤には界面活性剤をさらに含むことができる。界面活性剤としては、非イオン界面活性剤、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリテート、グリセリンモノステアレート等のグリセリン脂肪酸エステル；デカグリセリルモノステアレート、デカグリセ

- リルジステアレート、デカグリセリルモノリノレート等のポリグリセリン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビットテトラステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル；ポリオキシエチレングリセリルモノステアレート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル；ポリエチレングリコールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル；
- 15 ポリオキシエチエレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル；ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（ポリオキシエチレン水素ヒマシ油）等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油；ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘導体；ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体；ポリ
- 20 オキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等のHLB 6～18を有するもの；陰イオン界面活性剤、例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数10～18のアルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が2～4でアルキル基の炭素原子数
- 25 が10～18であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩；ラウリルスルホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が8～18のアルキルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセロリン脂質；スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質；炭素原子数12～18の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げる事ができる。本発

明の製剤には、これらの界面活性剤の1種または2種以上を組み合わせる添加することができる。

好ましい界面活性剤はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、特に好ましいのはポリソルベート20、21、40、60、65、80、81、85であり、最も好ましいのはポリソルベート20及び80である。

本発明のG-C-S-F含有製剤に添加する界面活性剤の添加量は、一般にはG-C-S-F 1重量部に対して0.0001~10重量部であり、好ましくはG-C-S-F 1重量部に対して0.01~5重量部であり、最も好ましくはG-C-S-F 1重量部に対して0.2~2重量部である。

10 本発明のG-C-S-F製剤のpHは好ましくは5~7であり、さらに好ましくはpHが5.5~6.8であり、さらに好ましくはpHが6~6.7であり、最も好ましくはpHが6.5である。

本発明のG-C-S-F製剤には、所望によりさらに希釈剤、溶解補助剤、賦形剤、pH調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含有してもよい。

15 例えば、含硫還元剤としては、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、並びに炭素原子数1~7のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等が挙げられる。また、酸化防止剤としては、エリソルビン酸、ジ  
20 ブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 $\alpha$ -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム  
25 等のキレート剤が挙げられる。さらには、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩などの通常添加される成分を含んでいてよい。

本発明のG-C-S-F製剤は溶液製剤、凍結乾燥製剤、噴霧乾燥製剤などを含む。

最も好ましくは凍結乾燥製剤である。

本発明の製剤は、これらの成分をリン酸緩衝液（好ましくはリン酸一水素ナトリウム－リン酸二水素ナトリウム系）及び／又はクエン酸緩衝液（好ましくはクエン酸ナトリウムの緩衝液）などの溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって溶液製剤を調製し、あるいはこのようにして調製された溶液製剤を定法により凍結乾燥、又は噴霧乾燥することによって製造できる。

本発明の安定化されたG－CSF含有製剤は通常非経口投与経路で、例えば注射剤（皮下注、静注、筋注など）、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与されるが、経口投与も可能である。

10 本発明のG－CSF製剤は、通常密封、滅菌されたプラスチックまたはガラス容器中に収納されており、使用時に純水（注射用滅菌水）に溶解して使用する。

本発明の製剤中に含まれるG－CSFの量は、治療すべき疾患の種類、疾患の重症度、患者の年齢などに応じて決定できるが、一般には最終投与濃度で1～1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは10～800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、さらに好ましくは50  
15 ～500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

本発明の製剤は、感染症や癌の化学治療において、抗生物質、抗菌剤、抗癌剤などの薬剤を投与する際に同時投与すると、患者の抵抗力、活性などといった免疫応答力に基づいた防御機能を改善することが判明しており、臨床上極めて有用である。従って、本発明の製剤はこれらの薬剤と併用投与することができる。

20 本発明のG－CSF製剤は後述の実施例に示すように、25℃－3ヶ月長期保存試験又は40℃－2ヶ月長期保存試験を行った後にも、あるいは50℃－1ヶ月間の加速試験又は60℃－2週間の加速試験を行った後にも、極めて良好なG－CSF残存率を示す。また、50℃－1ヶ月間の加速試験後又は60℃－2週間の加速試験を行った後にも、G－CSFのメチオニン残基酸化体生成率がほとんど観察されなかった。本発明のG－CSF製剤は25℃－3ヶ月長期保存試験  
25 後におけるG－CSF残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、40℃－2ヶ月長期保存試験後におけるG－CSF残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、50℃－1ヶ月間の加速試験後におけるG－CSF残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、60℃－2週間の加速試験後

におけるG-C-S-F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下、好ましくは検出限界以下である。

本発明の製剤では、後述する実施例の結果から、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸を添加することにより特に常温における長期保存後のG-C-S-F残存率を増加することができ、またメチオニンを添加することにより、G-C-S-Fのメチオニン残基酸化体生成率を検出限界以下にすることが観察された。本発明者らは、  
5 特定の理論に拘束されるつもりはないが、G-C-S-Fのメチオニン残基に代えて、添加されたメチオニンが酸化されることにより、G-C-S-Fのメチオニン残基酸化体生成率を低くすると推測した。  
10

さらに本発明によれば、特に、メチオニン残基の酸化体生成に、より影響を受けやすく、微量で生理活性を有する、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質の組成物にメチオニンを添加することにより、該生理活性タンパク質のメチオニン残基の酸化体生成を防止することができる。特に、該生理活性タンパク質組成物中に、安定化剤として他のタンパク質を含まない場合、タンパク質組成物が凍結乾燥されている場合、あるいはタンパク質組成物が溶液状態の場合には、タンパク質のメチオニン残基酸化体が生成しやすいことから、メチオニンの添加は  
15 有効であると考えられる。  
20

さらに本発明の組成物に、その他の一種以上のアミノ酸を添加することにより、メチオニン残基の酸化体生成を抑制し、且つ、生理活性タンパク質の分解、凝集等を抑えた、安定化された、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有組成物を製造することができる。

25 このとき添加するアミノ酸としては、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、プロリン、グリシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、チロシン等が挙げられ、好ましくは、ヒスチジン、アルギニン、フェニルアラニンである。

本発明の生理活性タンパク質としては、例えば、

- サイトカイン；インターロイキン（IL-1～IL-13など）、コロニー刺激因子（顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、
- 5 エリスロポエチン（EPO）等）、インターフェロン（IFN- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 等）、腫瘍壊死因子（TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 等）、Transforming growth factor（TGF）、platelet-derived growth factor（PDGF）、LIF（leukemia inhibitory factor）、oncostatin M（OSM）、migration inhibitory factor（MIF）、ケモカイン、IL-8、LD78、MCP-1など、
- 10 生理活性ペプチド；インシュリン、グルカゴン、パラサイロイドホルモン（PTH）、ガストリン、セレクチン、コレシストキニン、ガシトリック・インヒビトリー、ポリペプチド、サブスタンスP、モチリン、脾ポリペプチド、ニューロテンシン、エンテログルカゴン、ガストリン放出ペプチド、ソマトスタチン-28、ダイノルフィン、ガラニン、バロニン、パンクレオスタチン、ゼオプシンなど
- 15 生体酵素；メチオニン残基が活性中心に存在する酵素（例えば、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ等）など、

または、それらの変異体が挙げられる。

- 本発明の生理活性タンパク質としては、好ましくは、サイトカインまたは生理活性ペプチドであり、より好ましくは、G-CSF、エリスロポエチン等のコロ
- 20 ニー刺激因子またはPTHを示し、さらに好ましくは、G-CSF、エリスロポエチンまたはPTHを示す。

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

## 25 実施例

### 試験方法

バイアルあたりの各原料の添加量が下記の表1及び表2となるように各調剤液を調製し、無菌濾過を行った後、無菌的に各バイアルに1mLずつ正確に充填し、凍結乾燥に供した。凍結乾燥終了後、完全打栓し、G-CSF凍結乾燥製剤を製

造した。

【表 1】

表 1

	G-CSF	フェニルアラニン	アルギニン	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料. 1	250 $\mu$ g	10mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH7.4
試料. 2	250 $\mu$ g	10mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5

	G-CSF	フェニルアラニン	アルギニン	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料. 3	100 $\mu$ g	0mg	0mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 4	100 $\mu$ g	10mg	0mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 5	100 $\mu$ g	0mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 6	100 $\mu$ g	10mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5

	G-CSF	フェニルアラニン	アルギニン	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料. 7	250 $\mu$ g	0mg	0mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 8	250 $\mu$ g	10mg	0mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 9	250 $\mu$ g	0mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 10	250 $\mu$ g	10mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5

	G-CSF	アミノ酸. 1	アミノ酸. 2	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料. 11	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	リジン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 12	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	ヒスチジン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 13	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	アルギニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 14	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	アスパラギン酸	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 15	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	グルタミン酸	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 16	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	セリン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 17	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	トレオニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 18	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	チロシン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 19	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	アスパラギン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 20	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	グルタミン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5

フェニルアラニンの添加量は、いずれも10mg (60mMに相当)  
アミノ酸. 2の添加量は、60mM相当 (アミノ酸. 1と等モル)

	G-CSF	アミノ酸. 1	アミノ酸. 2	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料. 21	100 $\mu$ g	アルギニン	アラニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 22	100 $\mu$ g	アルギニン	バリン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 23	100 $\mu$ g	アルギニン	ロイシン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 24	100 $\mu$ g	アルギニン	イソロイシン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 25	100 $\mu$ g	アルギニン	メチオニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 26	100 $\mu$ g	アルギニン	トリプトファン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 27	100 $\mu$ g	アルギニン	フェニルアラニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 28	100 $\mu$ g	アルギニン	プロリン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 29	100 $\mu$ g	アルギニン	グリシン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 30	100 $\mu$ g	アルギニン	セリン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 31	100 $\mu$ g	アルギニン	トレオニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 32	100 $\mu$ g	アルギニン	アスパラギン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料. 33	100 $\mu$ g	アルギニン	グルタミン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5

アルギニンの添加量は、いずれも10mg (60mMに相当)  
アミノ酸. 2の添加量は、60mM相当 (アミノ酸. 1と等モル)

【表 2】

	G-CSF	Phe	Arg	Met	Mannitol	Polysorbate20	pH緩衝剤
試料.34	100 $\mu$ g	10mg	10mg	0mg	25mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料.35	100 $\mu$ g	10mg	10mg	0.1mg	25mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料.36	100 $\mu$ g	10mg	10mg	1mg	25mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5

このように無菌的に調製したG-C S F含有凍結乾燥製剤を、60℃の恒温槽内で2週間及び1ヶ月；50℃の恒温槽内で1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月；40℃の恒温槽内で2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月；並びに25℃の恒温槽内で3ヶ月、6ヶ月静置した。

- 5 加速品製剤、及び未加速品製剤は、1mLの純水で正確に溶解し、下記の方法の試験試料とした。

バイアル中のG-C S F含有量（残存率）を下記の方法1に基づき測定した。また、バイアル中のG-C S Fメチオニン残基酸化体生成率を下記の方法2に基づき測定した。

## 10 方法1

- 試料は、C4逆相カラム（4.6mm x 250mm、300オングストローム）を用い、純水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた逆相系高速液体クロマトグラフィー法によりG-C S F含量を測定した。G-C S Fとして5μg相当量を注入し、アセトニトリルのグラジエントによりG-C S Fを溶出させ、215nmの波長で分光学的に検出した。

本方法で測定したG-C S F含量を用い、下記の式に基づき、60℃-2週間、及び50℃-1ヶ月間加速後及び60℃で2週間及び1ヶ月；50℃で1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月；40℃で2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月；並びに25℃で3ヶ月、6ヶ月保存したときのG-C S F残存率を残存率（%）を算出した。

## 20 【式1】

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{(\text{所定期間の加速後のG-C S F 含量})}{(\text{未加速品のG-C S F 含量})} \times 100$$

## 25 方法2

試料は、C4逆相カラム（4.6mm x 250mm、300オングストローム）を用い、純水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた逆相系高速液体クロマトグラフィー法によりG-C S F未変化体及び、G-C S F Met 残基酸化体を測定した。アセトニトリルのグラジエントによりG-C S Fを溶出



させ、215 nmの波長で分光学的に検出した。

本方法で測定したG-CSF未変化体及びG-CSF Met 残基酸化体にピーク面積を用い、下記の式に基づき、60℃-2週間、及び50℃-1ヶ月間加速後のG-CSF Met 残基酸化体生成率(%)を算出した。

5       【式2】

$$\text{G-CSF Met 残基酸化体生成率(\%)} = \frac{(\text{G-CSF Met 残基酸化体})}{(\text{G-CSF 未変化体}) + (\text{未加速品の G-CSF 含量})} \times 100$$

10   実施例1：各種pHのG-CSF残存率に及ぼす効果

表1に記載の各種pHで調製した試料1及び試料2を、60℃-2週、及び50℃-1ヶ月間加速試験を行った後のG-CSF残存率を方法1に記載の式により算出した。得られた結果を表3に示す。

      【表3】

15

	試料.1 pH 7.4	試料.2 pH 6.5
50℃-1ヶ月間	97.7	99.7
60℃-2週間	95.8	97.1

20   pH 7.4処方に比べて、pH 6.5において、同等あるいはそれ以上の安定性を示した。

実施例2：各種アミノ酸のG-CSF残存率に及ぼす効果(1)

25   表1に記載の各種アミノ酸を添加して調製した試料3～6 (G-CSF含量100μg)、並びに試料7～10 (G-CSF含量250μg)を、60℃-2週間、及び50℃-1ヶ月間加速試験を行った後のG-CSF残存率を方法1に記載の式により算出した。得られた結果を表4及び表5に示す。

【表 4】

100  $\mu$ g G-CSF 含有製剤

	試料.3	試料.4	試料.5	試料.6
フェニルアラニン	無添加	10mg	無添加	10mg
アルギニン	無添加	無添加	10mg	10mg
50℃-1ヶ月間	72.9 %	84.8 %	82.4 %	98.3 %
60℃-2週間	67.2 %	77.9 %	68.8 %	95.0 %

5

【表 5】

250  $\mu$ g G-CSF 含有製剤

	試料.7	試料.8	試料.9	試料.10
フェニルアラニン	無添加	10mg	無添加	10mg
アルギニン	無添加	無添加	10mg	10mg
50℃-1ヶ月間	76.6 %	88.1 %	96.3 %	99.7 %
60℃-2週間	74.0 %	78.1 %	90.7 %	97.1 %

10

- 15      いずれのG-C S F含量においても、アミノ酸無添加処方比べて、フェニルアラニンを単独添加、あるいはアルギニンを単独添加した製剤では安定性が向上しているが、十分ではない。フェニルアラニンとアルギニンを併用することで安定性の顕著な向上が認められた。

## 20      実施例 3：各種アミノ酸のG-C S F残存率に及ぼす効果（2）

- 表 1 に記載の各種アミノ酸を添加して調製した試料 11～20（アミノ酸 1 としてフェニルアラニンを、アミノ酸 2 としてリジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンのいずれかを添加）、並びに試料 21～33（アミノ酸 1 としてアルギニンを、アミノ酸 2 としてアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、プロリン、グリシン、セリン、トレオニン、アスパラギン及びグルタミンのいずれかを添加）を、60℃-2週間、及び50℃-1ヶ月間加速試験を行った後のG-C S F残存率を方法 1 に記載の式により算出した。得られた結果を表 6 及び表 7 に示す。

25

【表 6】

	50°C-1ヶ月間	60°C-2週間
試料. 11	92.8%	91.2%
試料. 12	98.8%	97.5%
試料. 13	98.0%	96.0%
試料. 14	95.7%	96.7%
試料. 15	95.6%	94.0%
試料. 16	88.4%	87.8%
試料. 17	96.4%	90.7%
試料. 18	84.6%	81.7%
試料. 19	95.0%	95.3%
試料. 20	89.8%	87.2%

【表 7】

	50°C-1ヶ月間	60°C-2週間
試料. 21	89.0%	84.4%
試料. 22	88.9%	86.5%
試料. 23	96.3%	96.2%
試料. 24	88.5%	89.3%
試料. 25	95.5%	88.5%
試料. 26	101.4%	98.6%
試料. 27	97.0%	95.7%
試料. 28	89.4%	82.5%
試料. 29	90.9%	71.2%
試料. 30	89.2%	85.2%
試料. 31	90.6%	87.3%
試料. 32	94.0%	88.6%
試料. 33	90.1%	84.6%

フェニルアラニンとリジン、フェニルアラニンとヒスチジン、フェニルアラニンとアルギニン、フェニルアラニンとアスパラギン酸、フェニルアラニンとグルタミン酸、フェニルアラニンとトレオニン、フェニルアラニンとアスパラギンの組み合わせ、並びにアルギニンとロイシン、アルギニンとトリプトファン、アルギニンとフェニルアラニンの組み合わせにおいてそれぞれ顕著な長期保存安定性が観察された。

#### 実施例 4：長期保存試験

フェニルアラニン 10 mg、アルギニン 10 mg、メチオニン 1 mg を含み、G-C-S-F 含量が 100  $\mu$ g 及び 250  $\mu$ g の試料について、60°C で 2 週間及び 1 ヶ月；50°C で 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月；40°C で 2 ヶ月、4 ヶ月、6 ヶ月；並びに 25°C で 3 ヶ月、6 ヶ月保存したときの G-C-S-F 残存率を方法 1 に記載の式により算出した。得られた結果を表 8 に示す。

【表 8】

G-CSF ( $\mu$ g)	60°C		50°C			40°C			25°C	
	2W <sup>1</sup>	1M <sup>2</sup>	1M	2M	3M	2M	4M	6M	3M	6M
100	98.3	96.2	99.9	100.1	95.9	101.0	100.0	98.8	97.0	98.0
250	97.2	94.5	98.7	98.0	96.7	99.4	99.3	98.1	98.5	100.6

1: week

2: month

- 5 いずれも優れたG-C S F 残存率を示した。

実施例 5 : アミノ酸添加のG-C S F M e t 残基酸化体生成率に及ぼす効果

- 表 2 に記載の各量のメチオニンを添加して調製した試料 3 4 ~ 3 6 (フェニルアラニンとアルギニンの量は一定でメチオニン添加量がそれぞれ 0 m g , 0 . 1 m g , 1 m g ) を、6 0 ° C - 2 週間加速試験を行った後に上記方法 2 で実施したクロマトグラムの 1 例を図 1 に、調製直後及び 5 0 ° C - 1 ヶ月加速試験を行った後に上記方法 2 で実施したクロマトグラムの 1 例を図 2 に示す。

- メチオニン無添加試料 (試料 3 4) では調製直後並びに 5 0 ° C - 1 ヶ月保存後のいずれにおいても G-C S F M e t 残基酸化体の生成が観察されたが、0 . 1 m g 以上のメチオニンの添加により、長期保存後にも G-CSF Met 残基酸化体の生成を完全に抑制することができた。

また、G-C S F M e t 残基酸化体生成率を方法 2 に記載の式により算出した結果を表 9 に示す。

【表 9】

20

	試料.34 Met 0 mg	試料.35 Met 0.1 mg	試料.36 Met 1 mg
50°C-1 ヶ月間	1.2 %	N.D.	N.D.
60°C-2 週間	1.7 %	N.D.	N.D.

N.D. : 検出限界以下

- 25 このように、0 . 1 m g 以上のメチオニンの添加により、G-CSF Met 残基酸化体の生成を完全に抑制することができた。

実施例 6：パラサイロイドホルモン溶液製剤へのメチオニン添加による、メチオニン残基酸化抑制作用

1～84 残基を有するパラサイロイドホルモン（以下 PTH と略記）（WO 90 014415 に記載の方法で製造）を 200  $\mu$ g/mL を含み、バイアル当たりの各原料の添加量が下記の表 10 になるよう、試料 37～試料 39 の各調剤液を調整し、無菌濾過を行った後、無菌的に各バイアルに 1 mL ずつ正確に充填し、完全打栓し、PTH 溶液製剤を製造した。

【表 10】

試料	PTH	メチオニン	ポリソルベート-80	pH (クエン酸/リン酸緩衝液)
試料 37	200 $\mu$ g/mL	無添加	0.01%	6.5
試料 38	200 $\mu$ g/mL	0.01%	0.01%	6.5
試料 39	200 $\mu$ g/mL	0.1%	0.01%	6.5

10

このように無菌的に調整した PTH 含有溶液製剤を、50℃の恒温槽内に 3 日間、静置した。

試料は、C18 逆相カラム（4.6 mm x 250 mm、300 オングストローム）を用い、純水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた逆相系高速液体クロマトグラフィー法により PTH 含量を測定した。PTH として、10  $\mu$ g 相当量を注入し、アセトニトリルのグラジエントにより PTH を溶出させ、215 nm の波長で分光学的に検出した。

本試験系では、PTH 未変化体の直前に、図 3 に示したとおり、8 番目のメチオニン残基が酸化された PTH、18 番目のメチオニン残基が酸化された PTH が検出される。このクロマトグラムに示すとおり、PTH 中の 8 番目のメチオニン残基における酸化、および、PTH 中の 18 番目のメチオニン残基における酸化が、製剤中へのメチオニンの添加に伴い抑制可能であることが示されている。さらに、製剤中へのメチオニンの添加は、メチオニン残基以外の化学分解反応には影響を及ぼしてはいないこともわかる。すなわち、製剤中へのメチオニン添加により、他の化学分解反応には影響を与えず、タンパク質中のメチオニン残基酸

25

化体生成抑制のみを特異的に改善することが可能であることを示している。

#### 産業上の利用分野

- 本発明のG-C S F製剤は、長期保存後においてもG-C S Fの残存率が極めて高く、またG-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率をほぼ完全に抑制することのできる安定な製剤である。
- 5

## 請求の範囲

1. 25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下である、安定なG-C-S-F製剤。
- 10 2. リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含む請求項1記載のG-C-S-F製剤。
3. 疎水性アミノ酸がフェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから選択される請求項2記載のG-C-S-F製剤。
- 15 4. リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、フェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含む請求項1記載のG-C-S-F製剤。
- 20 5. フェニルアラニン、アルギニン及びメチオニンを含む請求項1記載のG-C-S-F製剤。
6. 安定化剤として、実質的にタンパク質を含まない請求項1~5のいずれかに記載のG-C-S-F製剤。
7. 凍結乾燥製剤である請求項1~6のいずれかに記載のG-C-S-F製剤。
- 25 8. マンニトールをさらに含む請求項1~7のいずれかに記載のG-C-S-F製剤。
9. 界面活性剤をさらに含む請求項1~8のいずれかに記載のG-C-S-F製剤。
10. 界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルである請求項9記載のG-C-S-F製剤。
11. 界面活性剤がポリソルベート20及び/又は80である請求項10記載の

G-C S F 製剤。

1 2. pHが5～7である請求項1～11のいずれかに記載のG-C S F 製剤。

1 3. pHが5.5～6.8である請求項12記載のG-C S F 製剤。

1 4. pHが6.5である請求項13記載のG-C S F 製剤。

5 1 5. G-C S FがCHO細胞から産生されたG-C S Fである請求項1～14のいずれかに記載のG-C S F 製剤。

1 6. リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸を含み、pHが5～7であることを特徴とする、25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C S F 残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-C S F 残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C S F 残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F 残存率が90%以上である、安定なG-C S F 製剤。

15 1 7. リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、フェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸を含み、pHが5～7であることを特徴とする、25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C S F 残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-C S F 残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C S F 残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F 残存率が90%以上である、安定なG-C S F 製剤。

1 8. pHが6.5である請求項15又は16記載のG-C S F 製剤。

1 9. 実質的にメチオニン酸化体を生成しない、G-C S F 安定化製剤。

25 2 0. メチオニンと他の一種以上のアミノ酸を含み、実質的にメチオニン酸化体を生成しない、G-C S F 安定化製剤。

2 1. 安定化剤として、実質的にタンパク質を含まない請求項19又は20記載のG-C S F 安定化製剤。

2 2. メチオニンを、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有組成物に



添加することを特徴とする、該タンパク質のメチオニン残基酸化体生成の抑制方法。

23. 生理活性タンパク質が、サイトカインまたは生理活性ペプチドである請求項22記載の方法。

5 24. 生理活性タンパク質が、コロニー刺激因子またはPTHである請求項22記載の方法。

25. 生理活性タンパク質が、G-CSF、エリスロポエチンまたはPTHである請求項22記載の方法。

10 26. 安定化剤として他のタンパク質を含まないことを特徴とする請求項22～25のいずれかに記載の方法。

27. メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有組成物が、凍結乾燥されているかまたは溶液状態であることを特徴とする請求項22～26のいずれかに記載の方法。

15 28. メチオニンと他の一種以上のアミノ酸を含む、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有安定化組成物。

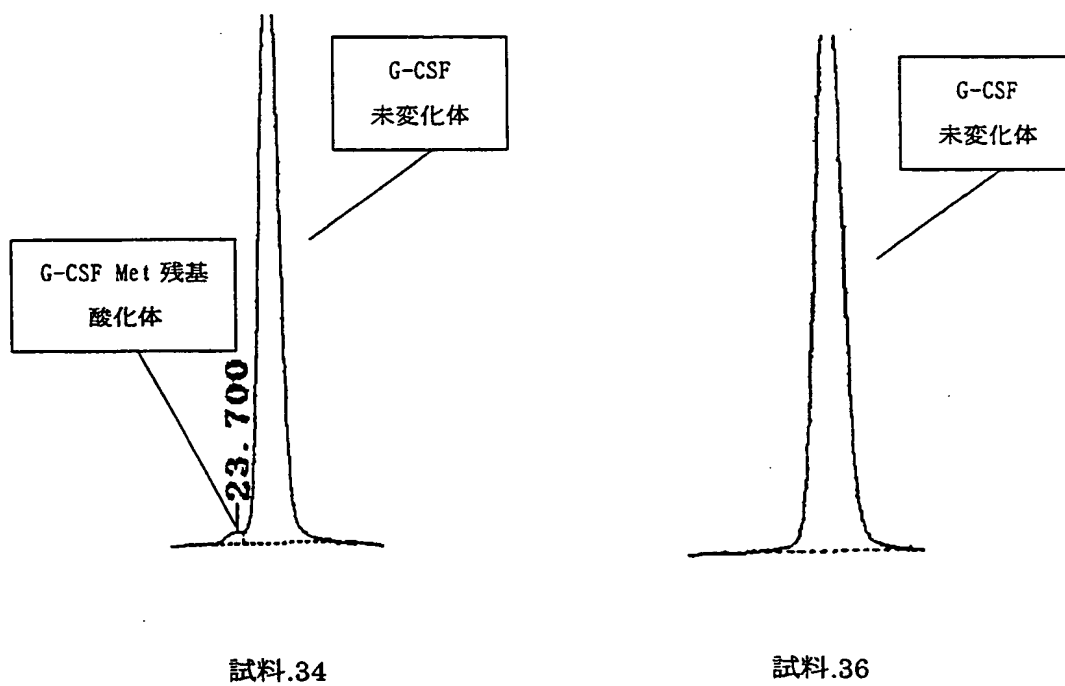
29. アミノ酸が、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、プロリン、グリシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン及びチロシンから成る群より選ばれる1種または2種以上である請求項28記載の組成物。

20

30. 安定化剤として他のタンパク質を含まないことを特徴とする請求項28または29記載の組成物。

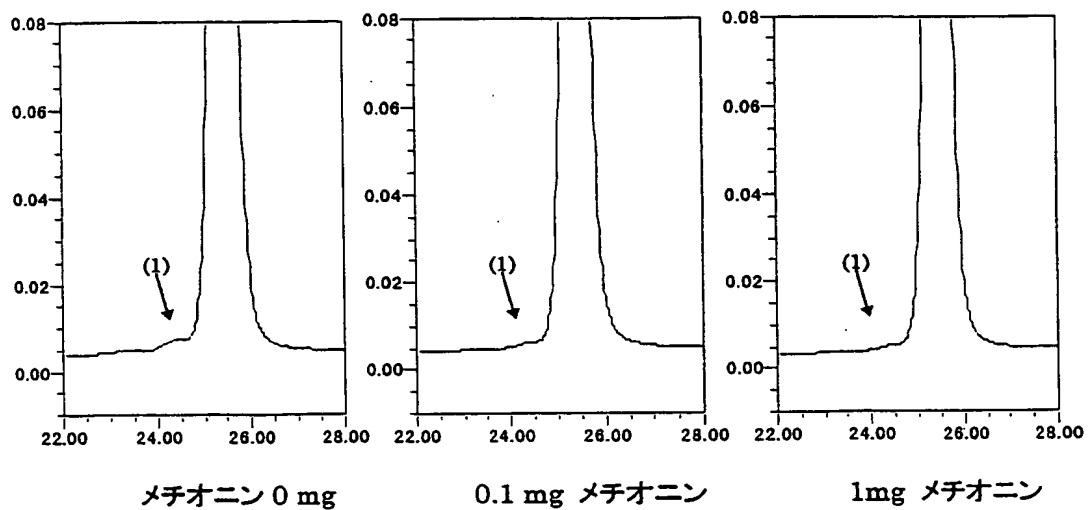
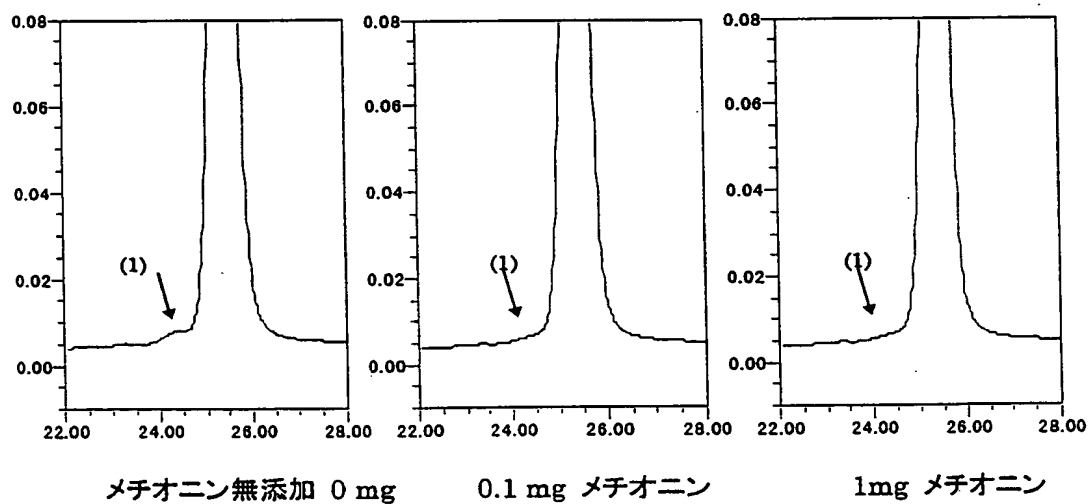
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 1



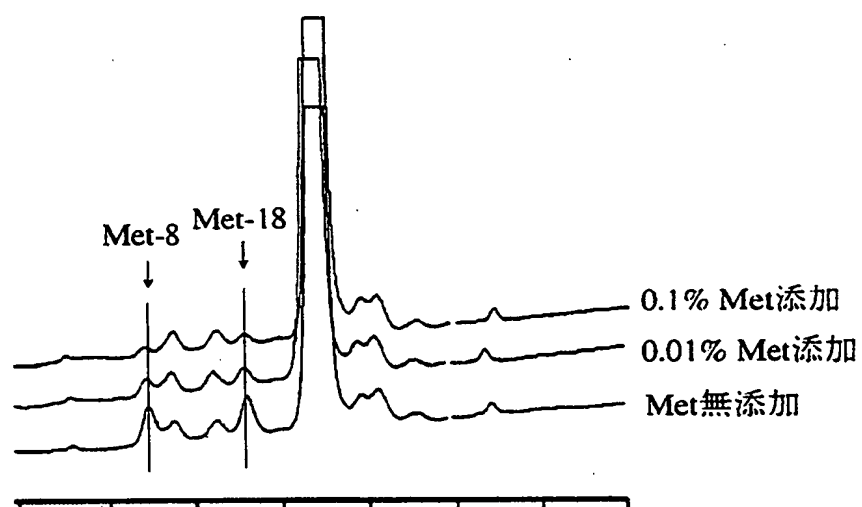
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 図 2

未加速品50°C-1 ヶ月加速品

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 3



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01160

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN) , MEDLINE (STN) , BIOSIS (STN) , WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	WO, 92/15614, A1 (CHIRON OPHTHALMICS, INC.), 17 September, 1992 (17.09.92), page 5, line 26 to page 6, line 20; examples I-V, & US, 5272135, A	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30
X - Y	US, 5358708, A (SCHERING CORPORATION), 25 October, 1994 (25.10.94), See Esp. examples 1-4, (Family: none)	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30
X - Y	EP, 853945, A1 (AKZO NOBEL N. V.), 22 July, 1998 (22.07.98), See example 2 & JP, 10-203997, A & US, 5929028, A	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30
X - Y	WO, 94/13143, A1 (APPLIED MICROBIOLOGY, INC.), 23 June, 1994 (23.06.94), page 1, lines 5 to 19; page 4, lines 30 to 31; Tables 7-9, & JP, 8-510716, A & EP, 673199, A1 & US, 5763375, A	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search  
07 April, 2000 (07.04.00)Date of mailing of the international search report  
18.04.00Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01160

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	JP, 5-331071, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 14 December, 1993 (14.12.93), Claims; Par. Nos. 0009 to 0012; Tables 1,2,5, (Family: none)	22,23,26,27  1-21,24,25, 28-30
X - Y	JP, 3-287540, A (Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.), 18 December, 1991 (18.12.91), Claims; Table 1(Sample 4), (Family: none)	22,23,26,27  1-21,24,25, 28-30
Y	WO, 94/14465, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH), 07 July, 1994 (07.07.94), Cited in the application, page 6, line 8 to page 9, line 9; examples 3 to 14, & JP, 8-504784, A & EP, 674524, A1 & US, 5919443, A	1 - 30
Y	JP, 63-146829, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 June, 1988 (18.06.88), Claim 3; Table 1,2, (Family: none)	1 - 30
A	RIISOM, T., et al., 'Effect of amino acids on the autoxidation of safflower oil in emulsions' J. Am. Oil Chem. Soc., 1980, Vol. 57, No.10, p.354-359, Abstract; Table II, Figs. 1-6	1 - 30
A	US, 4915945, A (BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT), 10 April, 1990 (10.04.90), Column 2, line 39 to Column 3, line 6, & JP, 5-306236, A & EP, 101935, A1	1 - 30

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/01160

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> A61K38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> A61K38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X — Y	WO, 92/15614, A1 (CHIRON OPHTHALMICS, INC.), 17. 9月. 1992 (17. 09. 92), 第5頁第26行—第6頁第20行, 実施例 I—V 参照, & US, 5272135, A	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30
X — Y	US, 5358708, A (SCHERING CORPORATION), 25. 10月. 1994 (25. 10. 94), 特に実施例 1—4 参照, ファミリーなし	22-24, 26, 27  1-21, 25, 28-30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 04. 00

国際調査報告の発送日

18.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4C

9639

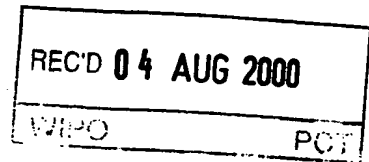
電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X — Y	EP, 853945, A1 (AKZO NOBEL N. V.), 22. 7月. 1998 (22. 07. 98), 実施例2参照, & JP, 10-203997, A & US, 5929028, A	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30
X — Y	WO, 94/13143, A1 (APPLIED MICROBIOLOGY, INC.), 23. 6月. 1994 (23. 06. 94), 第1頁第5-19行, 第4頁第30-31行, 表7-9参照, & JP, 8-510716, A, & EP, 673199, A1, & US, 5763375, A	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30
X — Y	JP, 5-331071, A (旭化成工業株式会社), 14. 12月. 1993 (14. 12. 93), 特許請求の範囲, 段落0009-0012, 表1, 2, 5参照, ファミリーなし	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30
X — Y	JP, 3-287540, A (帝国臓器製薬株式会社), 18. 12月. 1991 (18. 12. 91), 特許請求の範囲, 表1 (サンプル4) 参照, ファミリーなし	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30
Y	WO, 94/14465, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH), 7. 7月. 1994 (07. 07. 94), 本願中に引用, 第6頁第8行-第9頁第9行, 実施例3-14参照, & JP, 8-504784, A, & EP, 674524, A1, & US, 5919443, A	1 - 30
Y	JP, 63-146829, A (中外製薬株式会社), 18. 6月. 1988 (18. 06. 88), 特許請求の範囲第3項, 第1, 2表参照, ファミリーなし	1 - 30
Y	RIISOM, T., et al., 'Effect of amino acids on the autoxidation of safflower oil in emulsions' J. Am. Oil Chem. Soc., 1980, Vol. 57, No. 10, p. 354-359, 要約, 表II, 図1-6参照	1 - 30
A	US, 4915945, A (BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT), 10. 4月. 1990 (10. 04. 90), 第2欄第39行-第3欄第6行参照, & JP, 5-306236, A & EP, 101935, A1	1 - 30

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕



出願人又は代理人 の書類記号 YCT-459	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/01160	国際出願日 (日.月.年) 29.02.00	優先日 (日.月.年) 01.03.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. 7 A61K38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14		
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input checked="" type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 29.02.00	国際予備審査報告を作成した日 19.07.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新留 豊	4C 9639
電話番号 03-3581-1101 内線 3452		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。
4. 補正により、下記の書類が削除された。
- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図
5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-21, 25, 28-30	有
	請求の範囲	22-24, 26, 27	無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-30	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-30	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

## [国際調査報告で引用された文献]

文献1: WO, 92/15614, A1 (CHIRON OPHTHALMICS, INC.),  
17. 9月. 1992 (17. 09. 92)

文献2: US, 5358708, A (SCHERING CORPORATION),  
25. 10月. 1994 (25. 10. 94)

文献3: EP, 853945, A1 (AKZO NOBEL N. V.),  
22. 7月. 1998 (22. 07. 98)

文献4: WO, 94/13143, A1 (APPLIED MICROBIOLOGY, INC.),  
23. 6月. 1994 (23. 06. 94)

文献5: JP, 5-331071, A (旭化成工業株式会社),  
14. 12月. 1993 (14. 12. 93)

文献6: JP, 3-287540, A (帝国臓器製薬株式会社),  
18. 12月. 1991 (18. 12. 91)

文献7: WO, 94/14465, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH),  
7. 7月. 1994 (07. 07. 94)

文献8: JP, 63-146829, A (中外製薬株式会社),  
18. 6月. 1988 (18. 06. 88),

文献9: RIISOM, T., et al., 'Effect of amino acids on the autoxidation of safflower oil in emulsions'  
J. Am. Oil Chem. Soc., 1980, Vol. 57, No.10, p.354-359

## [説明]

(A) 文献1-6には、メチオニン残基を有するEGF、あるいはGM-CSF等の生理活性タンパク質を含有する液体あるいは凍結乾燥製剤に、安定化剤としてメチオニン(methionine)を添加することが記載されている。その具体的メカニズムとしては、文献1-3に記載のとおり、生理活性タンパク質に含まれるメチオニン残基の酸化を防止することであると認められる。(以下、補充欄に続く)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

したがって、請求の範囲 22-24, 26, 及び 27 に係る発明は、新規性を有さない。

(B) 文献 2、4-6 及び 8 にも記載のとおり、生理活性タンパク質の安定化には、従来よりヒスチジン、リジン等、種々のアミノ酸が用いられてきたことが公知である。特に文献 7 には、G-CSF においてはアルギニン及びフェニルアラニンが、優れたタンパク質安定化効果を有することが記載されている。また文献 9 にも記載のとおり、フェニルアラニンやアルギニン等あのアミノ酸もメチオニンとほぼ同等の抗酸化活性を有することが公知である。

したがって、タンパク質中のアミノ酸残基の酸化を防止する目的で、フェニルアラニンやアルギニンをはじめとする、種々のアミノ酸を上記生理活性タンパク質の安定化に用いてみることも、当業者に自明の事項である。

よって、請求の範囲 22-24, 26-30 に係る発明は進歩性を有さない。

(C) 文献 1 には、種々のメチオニン残基含有タンパク質も安定化し得ること、文献 2 にはコロニー刺激因子の一種である GM-CSF が安定化されること、また、文献 7、8 には G-CSF のアミノ酸添加による安定化剤が記載され、文献 8 には G-CSF がメチオニン残基を有するものであることが、具体的に記載されているので、メチオニンにより安定化される生理活性タンパク質として、G-CSF を選択することは当業者に自明である。

その際、文献 3、4、7 にも記載される周知の添加剤であるポリソルベート (poly sorbate) 等の界面活性剤、あるいは文献 5-7 にも記載される、マンニトール等周知の糖アルコール安定化剤を添加することは、当業者に自明である。同様に、中性付近での最適な pH を設定することも、当業者に自明である。

そして、その効果についても、本願で採用される G-CSF の残存率についての計算式でもって、上記文献から予測されるメチオニンのタンパク質安定化作用とは直接比較できず、これに比べ格別の効果があるとは、直ちには認められない。すなわち、本願の計算式は未加速の G-CSF 製剤を分母とするものであり、(1) 前記未加速の G-CSF 製剤がどのような条件で保存されたものか明示されておらず、さらに (2) 上記文献で採用されている残存率の計算式 (例えば、本願と同じ出願人による文献 8 の残存活性の計算式は、G-CSF の初期活性単位を分母とする) とは異なるものであるので、従来技術と比べ、格別な効果があると明確に認めることはできない。

よって、請求の範囲 1-21 及び 25 に係る発明は、進歩性を有さない。

以上より、請求の範囲 1-30 に係る発明は、進歩性を有さない。

請求の範囲 1-30 に係る発明は、産業上の利用可能性を有する。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

1. 請求の範囲第1項は、G-C S F 製剤をその含有物質でなく、その性質のみによって限定しようとする記載がなされており、このような記載は不明瞭と判断される場合がある。
2. G-C S F 製剤の残存活性の計算式に関し、「未加速品」（明細書第14頁）の保存条件が不明確である。（第V欄の記述も参照）
3. タンパク質は一般に多様な構造とアミノ酸配列を有するものであることを考慮すると、メチオニンの安定化効果は理解できるものの、その他のアミノ酸とメチオニンの組み合わせが、あらゆるメチオニン残基含有タンパク質に対して、相乗的な効果を発揮するかという点には、疑問を抱かざるを得ない。この点は特に、第V欄で指摘した進歩性に関して、アミノ酸の組み合わせによる相乗的効果を主張される場合に、十分検討されるべきである。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHAMOTO, Ichio  
Yuasa and Hara  
Section 206, New Ohtemachi Bldg.  
2-1, Ohtemachi 2-chome  
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004  
JAPON

00.5.-8

Date of mailing (day/month/year) 27 April 2000 (27.04.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference YCT-459	
International application No. PCT/JP00/01160	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
International filing date (day/month/year) 29 February 2000 (29.02.00)	Priority date (day/month/year) 01 March 1999 (01.03.99)
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
01 Marc 1999 (01.03.99)	11/52314	JP	14 Apr 2000 (14.04.00)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Somsak Thiphrakesone

Telephone No. (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHAMOTO, Ichio  
Yuasa and Hara  
Section 206, New Ohtemachi Bldg.  
2-1, Ohtemachi 2-chome  
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004  
JAPON

2000. 9. 18  
DIV.  
JAPAN AND W.

Date of mailing (day/month/year) 08 September 2000 (08.09.00)		
Applicant's or agent's file reference YCT-459		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/01160	International filing date (day/month/year) 29 February 2000 (29.02.00)	Priority date (day/month/year) 01 March 1999 (01.03.99)
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU, KP, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AL, AM, AP, AT, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on

08 September 2000 (08.09.00) under No. WO 00/51629

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 08 September 2000 (08.09.00)	
International application No.: PCT/JP00/01160	Applicant's or agent's file reference: YCT-459
International filing date: 29 February 2000 (29.02.00)	Priority date: 01 March 1999 (01.03.99)
Applicant: SATO, Yasushi	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
29 February 2000 (29.02.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01160

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	WO, 92/15614, A1 (CHIRON OPHTHALMICS, INC.), 17 September, 1992 (17.09.92), page 5, line 26 to page 6, line 20; examples I-V, & US, 5272135, A	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30
X - Y	US, 5358708, A (SCHERING CORPORATION), 25 October, 1994 (25.10.94), See Esp. examples 1-4, (Family: none)	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30
X - Y	EP, 853945, A1 (AKZO NOBEL N. V.), 22 July, 1998 (22.07.98), See example 2 & JP, 10-203997, A & US, 5929028, A	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30
X - Y	WO, 94/13143, A1 (APPLIED MICROBIOLOGY, INC.), 23 June, 1994 (23.06.94), page 1, lines 5 to 19; page 4, lines 30 to 31; Tables 7-9, & JP, 8-510716, A & EP, 673199, A1 & US, 5763375, A	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 April, 2000 (07.04.00)Date of mailing of the international search report  
18.04.00Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01160

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	JP, 5-331071, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 14 December, 1993 (14.12.93), Claims; Par. Nos. 0009 to 0012; Tables 1, 2, 5, (Family: none)	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30
X - Y	JP, 3-287540, A (Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.), 18 December, 1991 (18.12.91), Claims; Table 1 (Sample 4), (Family: none)	22, 23, 26, 27  1-21, 24, 25, 28-30
Y	WO, 94/14465, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH), 07 July, 1994 (07.07.94), Cited in the application, page 6, line 8 to page 9, line 9; examples 3 to 14, & JP, 8-504784, A & EP, 674524, A1 & US, 5919443, A	1 - 30
Y	JP, 63-146829, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 June, 1988 (18.06.88), Claim 3; Table 1, 2, (Family: none)	1 - 30
A	RIISOM, T., et al., 'Effect of amino acids on the autoxidation of safflower oil in emulsions' J. Am. Oil Chem. Soc., 1980, Vol. 57, No.10, p.354-359, Abstract; Table II, Figs. 1-6	1 - 30
A	US, 4915945, A (BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT), 10 April, 1990 (10.04.90), Column 2, line 39 to Column 3, line 6, & JP, 5-306236, A & EP, 101935, A1	1 - 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHAMOTO, Ichio  
Yuasa and Hara  
Section 206, New Ohtemachi Bldg.  
2-1, Ohtemachi 2-chome  
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 08 September 2000 (08.09.00)		
Applicant's or agent's file reference YCT-459		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP00/01160	International filing date (day/month/year) 29 February 2000 (29.02.00)	
		Priority date (day/month/year) 01 March 1999 (01.03.99)
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, BR, CA, CN, CZ, DE, IL, JP, KP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BY, CH, CR, CU, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW, MX, PT, SD, SG,  
SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**  
**NOTIFICATION OF TRANSMITTAL**  
**OF COPIES OF TRANSLATION**  
**OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY**  
**EXAMINATION REPORT**

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHAMOTO, Ichio  
 Yuasa and Hara  
 Section 206, New Ohtemachi Bldg.  
 2-1, Ohtemachi 2-chome  
 Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004  
 JAPON

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 14 March 2001 (14.03.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
<b>Applicant's or agent's file reference</b> YCT-459	
<b>International application No.</b> PCT/JP00/01160	<b>International filing date (day/month/year)</b> 29 February 2000 (29.02.00)
<b>Applicant</b> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al	

**1. Transmittal of the translation to the applicant.**

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

**2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.**

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AT,AU,CA,CH,CN,CZ,FI,KP,NO,NZ,PL,RO,RU,SK,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,AE,AL,AM,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CR,CU,DE,DK,DM,EE,ES,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,PT,SD,SE,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

**3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).**

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

**It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.**

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Eliott Peretti  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

12T  
Translation

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference YCT-459	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/01160	International filing date (day/month/year) 29 February 2000 (29.02.00)	Priority date (day/month/year) 01 March 1999 (01.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14		
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 29 February 2000 (29.02.00)	Date of completion of this report 19 July 2000 (19.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01160

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01160

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-21,25,28-30	YES
	Claims	22-24,26,27	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-30	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-30	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Documents cited in the international search report.

Document 1: WO, 92/15614, A1 (Chiron Ophthalmics, Inc.) 17 September 1992 (17.09.92)

Document 2: US, 5358708, A (Schering Corp.) 25 October 1994 (25.10.94)

Document 3: EP, 853945, A1 (Akzo Nobel N. V.) 22 July 1998 (22.07.98)

Document 4: WO, 94/13143, A1 (Applied Microbiology, Inc.) 23 June 1994 (23.06.94)

Document 5: JP, 5-331071, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) 14 December 1993 (14.12.93)

Document 6: JP, 3-287540, A (Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.) 18 December 1991 (18.12.91)

Document 7: WO, 94/14465, A1 (Boehringer Mannheim GmbH), 7 July 1994 (07.07.94)

Document 8: JP, 63-146829, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) 18 June 1988 (18.06.88)

Document 9: Riisom, T., et al., "Effect of amino acids on the autoxidation of safflower oil in emulsions," J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 57, No. 10, 1980, p. 354-359

#### Commentary

(A) Documents 1-6 describe the addition of methionine as a stabilizer to liquid or freeze-dried drugs containing physiologically active proteins such as EGF or GM-CSF and the like that have methionine residues. As stated in documents 1-3, the specific mechanism is that the addition of methionine prevents the oxidation of methionine residues that are contained in physiologically active proteins.

Therefore, the inventions set forth in Claims 22-24, 26 and 27 do not appear to be novel.

(B) As stated in documents 2, 4-6, and 8, it is public knowledge that various amino acids such as histidine, lysine, and the like have been used for a long time for the stabilization of physiologically active proteins. In particular, document 7 states that arginine and phenylalanine have an excellent protein stabilizing effect in the case of G-CSF. Furthermore, as described in document 9, it is public knowledge that amino acids such as phenylalanine and arginine have essentially the same antioxidant activity as methionine.

Therefore, it is an obvious matter to persons skilled in the art to use various amino acids, including phenylalanine and arginine, to stabilize the above physiologically active proteins for the purpose of preventing oxidation of amino acid residues in the protein.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01160

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

### Continuation of Box V (Citations and explanations):

As a result, the inventions set forth in Claims 22-24 and 26-30 do not appear to involve an inventive step.

(C) Document 1 states that various proteins containing methionine residues can be stabilized, document 2 describes the stabilization of GM-CSF, which is a colony stimulating factor, and documents 7 and 8 describe a preparation of G-CSF that has been stabilized by the addition of amino acids. Furthermore, because document 8 specifically states that G-CSF contains methionine residues, it is obvious to persons skilled in the art to select G-CSF as a physiologically active protein that will be stabilized by methionine.

It is an obvious matter to persons skilled in the art to add a surfactant such as polysorbate and the like, which is a publicly known additive described in documents 3, 4, and 7, and a publicly known sugar alcohol stabilizing agent such as mannitol and the like, which is described in documents 5-7 during this process. Likewise, it is an obvious matter to persons skilled in the art to select an optimal pH near neutrality.

This examination also finds that, with the formula used in this application to calculate the residual G-CSF ratio, it is impossible to make a direct comparison with the protein stabilizing effect of methionine predicted by the above documents, and a particular advantage cannot be immediately recognized. More specifically, the formula in this application uses the amount of unaccelerated G-CSF preparation as the denominator, but (1) it is unclear under what conditions the unaccelerated G-CSF preparation is stored, and (2) this is different from the formula for calculating residual G-CSF ratio in the above documents (for example, the formula for calculating residual activity in document 8, which was written by the same applicant, uses the initial activity unit of G-CSF as the denominator). Therefore, this examination cannot find a clear advantage in comparison with prior art.

As a result, the inventions set forth in Claims 1-21 and 25 do not appear to involve an inventive step.

Based on the above explanation, the inventions set forth in Claims 1-30 do not appear to involve an inventive step.

The inventions set forth in Claims 1-30 do appear to have industrial applicability.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01160

### VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Item 1 of the Claims is a description of a G-CSF preparation based only by its properties rather than the substances it contains, and this kind of description can be considered vague.
2. With respect to the formula for calculating the residual activity of the G-CSF preparation, the storage conditions of the "unaccelerated product" (page 14 of the Specification) are unclear (See comments in Box V.)
3. In light of the fact that proteins are generally entities having various structures and amino acid sequences, although the stabilizing effect of methionine can be understood, the assertion that combinations of methionine and other amino acids will have a synergistic effect on all proteins containing methionine is suspect. With respect to the inventive step requirement discussed in Box V, a sufficient investigation must be made before asserting that a combination of amino acids has a synergistic effect.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified application was filed, and that I believe the English translation of International Application No. PCT/JP00/01160 is a true and complete translation of the above-identified International Application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Dated this 21st day of August, 2001

Full name of the translator: Hiroko EJIRI

Signature of the translator:



Post Office Address: c/o YUASA AND HARA, Section 206,  
New Ohtemachi Bldg., 2-1,  
Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku,  
Tokyo, JAPAN

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PCT REQUEST

<b>0</b>	<b>Receiving Office only</b>	
<b>0-1</b>	International Application No.	
<b>0-2</b>	International Filing Date	28.2.00
<b>0-3</b>	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
<b>0-4</b>	<b>Form - PCT/RO/101 PCT Request</b>	
<b>0-4-1</b>	Prepared using	<b>PCT-EASY Version 2.90 (updated 15.12.1999)</b>
<b>0-5</b>	<b>Petition</b> The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
<b>0-6</b>	<b>Receiving Office (specified by the applicant)</b>	<b>Japanese Patent Office (RO/JP)</b>
<b>0-7</b>	<b>Applicant's or agent's file reference</b>	<b>YCT-459</b>
<b>I</b>	<b>Title of invention</b>	<b>LONG-TERM STABILIZED FORMULATIONS</b>
<b>II</b>	<b>Applicant</b>	
<b>II-1</b>	This person is:	<b>applicant only</b>
<b>II-2</b>	Applicant for	<b>all designated States except US</b>
<b>II-4</b>	Name	<b>CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA</b>
<b>II-5</b>	Address:	<b>5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543 Japan</b>
<b>II-6</b>	State of nationality	<b>JP</b>
<b>II-7</b>	State of residence	<b>JP</b>
<b>III-1</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
<b>III-1-1</b>	This person is:	<b>applicant and inventor</b>
<b>III-1-2</b>	Applicant for	<b>US only</b>
<b>III-1-4</b>	Name (LAST, First)	<b>SATO, Yasushi</b>
<b>III-1-5</b>	Address:	<b>c/o Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha 41-8, Takada 3-chome, Toshima-ku, Tokyo 171-8545 Japan</b>
<b>III-1-6</b>	State of nationality	<b>JP</b>
<b>III-1-7</b>	State of residence	<b>JP</b>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PCT REQUEST

YCT-459

IV-1	<b>Agent r c mm n r representative; r address f r c rresp ndence</b> The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	<b>agent</b>  <b>SHAMOTO, Ichio</b> <b>YUASA AND HARA</b> <b>Section 206, New Ohtemachi Bldg,</b> <b>2-1, Ohtemachi 2-chome,</b> <b>Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004</b> <b>Japan</b> <b>03-3270-6641</b> <b>03-3246-0233</b> <b>yulawpat@yuasa-hara.co.jp</b>
IV-1-1	Name (LAST, First)	
IV-1-2	Address:	
IV-1-3	Telephone No.	
IV-1-4	Facsimile No.	
IV-1-5	e-mail	
IV-2	Additional agent(s)	<b>additional agent(s) with same address as first named agent</b>  <b>IMAI, Shisuke; MASUI, Chuji; KURITA, Tadahiko; KOBAYASHI, Yasushi; EJIRI, Hiroko</b>
V	Designation of States	
V-1	<b>Regional Patent</b> (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	<b>AP: GH GM KE LS MW SD SL SZ TZ UG ZW</b> <b>and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT</b> <b>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT</b> <b>EP: AT BE CH&amp;LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT</b> <b>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT</b>
V-2	<b>National Patent</b> (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	<b>AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA</b> <b>CH&amp;LI CN CR CU CZ DE DK DM EE ES FI GB</b> <b>GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG</b> <b>KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG</b> <b>MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE</b> <b>SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ</b> <b>VN YU ZA ZW</b>



1. *Pharmaceuticals*: The pharmaceutical industry is a major contributor to the U.S. economy, with sales exceeding \$400 billion in 2019. The industry is heavily regulated by the FDA, which oversees the safety, efficacy, and quality of drugs. The industry is also facing increasing pressure from payers (insurers and governments) to reduce costs, leading to a focus on value-based pricing and generic competition.

— *Chrysomelidae* (100%)

... ..

1. The first step is to identify the problem or question that needs to be answered. This involves understanding the context and the specific requirements of the task.

## PCT REQUEST

<b>V-5</b>	<b>Precautionary Designation Statement</b> In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
<b>V-6</b>	<b>Exclusion(s) from precautionary designations</b>	<b>NONE</b>	
<b>VI-1</b>	<b>Priority claim of earlier national application</b>		
VI-1-1	Filing date	<b>01 March 1999 (01.03.1999)</b>	
VI-1-2	Number	<b>52314/1999</b>	
VI-1-3	Country	<b>JP</b>	
<b>VI-2</b>	<b>Priority document request</b> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	<b>VI-1</b>	
<b>VII-1</b>	<b>International Searching Authority Chosen</b>	<b>Japanese Patent Office (JPO) (ISA/JP)</b>	
<b>VIII</b>	<b>Check list</b>	number of sheets	electronic file(s) attached
VIII-1	Request	<b>4</b>	-
VIII-2	Description	<b>20</b>	-
VIII-3	Claims	<b>3</b>	-
VIII-4	Abstract	<b>1</b>	-
VIII-5	Drawings	<b>3</b>	-
VIII-7	TOTAL	<b>31</b>	
	<b>Accompanying items</b>	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
VIII-8	Fee calculation sheet	✓	-
VIII-16	PCT-EASY diskette	-	<b>diskette</b>
<b>VIII-18</b>	<b>Figure of the drawings which should accompany the abstract</b>		
<b>VIII-19</b>	<b>Language of filing of the international application</b>	<b>Japanese</b>	
<b>IX-1</b>	<b>Signature of applicant or agent</b>		
IX-1-1	Name (LAST, First)	<b>SHAMOTO, Ichio (seal)</b>	
<b>IX-2</b>	<b>Signature of applicant or agent</b>		
IX-2-1	Name (LAST, First)	<b>IMAI, Shisuke (seal)</b>	
<b>IX-3</b>	<b>Signature of applicant or agent</b>		
IX-3-1	Name (LAST, First)	<b>MASUI, Chuji (seal)</b>	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PCT REQUEST

IX-4	Signature of applicant or agent	
IX-4-1	Name (LAST, First)	KURITA, Tadahiko (seal)
IX-5	Signature of applicant or agent	
IX-5-1	Name (LAST, First)	KOBAYASHI, Yasushi (seal)
IX-6	Signature of applicant or agent	
IX-6-1	Name (LAST, First)	EJIRI, Hiroko (seal)

## FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/JP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

## FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**





(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT 18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-459	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/01160	国際出願日 (日.月.年) 29.02.00	優先日 (日.月.年) 01.03.99	
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT 18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☐ 出願人が提出したものを承認する。

☒ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 第Ⅲ欄 要約 (第1ページの5の続き)

25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-CSFのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下である、安定なG-CSF製剤。メチオニンを、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有組成物に添加することを特徴とする、該タンパク質のメチオニン残基酸化体生成の抑制方法も開示される。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**